

УДК 616-001-06-097+575:355

М.С. Кишеня, Д.В. Соболев, А.В. Висягин, Е.В. Анчикова

ФГБОУ ВО «Донецкий государственный медицинский университет имени М. Горького» МЗ РФ, Донецк

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ ПОЛИМОРФИЗМА rs1800471 ГЕНА TGFB1 С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ БОЕВОЙ ТРАВМЕ И ЦИТОКИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИЕЙ

Проблема осложнений в отдаленном послеоперационном периоде при боевой травме, становится все более актуальной. Это связано с массивным применением высокоэнергетических систем вооружений в вооруженных конфликтах, обширным разрушением тканей при ранении, тяжелыми комбинированными и сочетанными повреждениями [1-3]. В частности, проблема формирования посттравматических патологических рубцов в отдаленном послеоперационном периоде занимает как хирургов, так и патофизиологов. Дисбаланс репаративных механизмов приводит к формированию атрофических, гипертрофических рубцов и келоидов.

По данным ВОЗ ежегодно во всем мире различные оперативные вмешательства проводятся у более 100 млн. человек, из которых у 4-10% формируются келоидные и гипертрофические рубцы [4]. Хирургическое лечение келоидных рубцов в 50-100% случаев приводит к еще более тяжелым рецидивам [5]. К факторам риска формирования посттравматических патологических рубцов (ПР) относят степень тяжести патологического процесса, длительность течения раневого процесса, длительность периода времени от появления раны до начала специализированного лечения, а также формирование ПР в анамнезе и развитие рецидивов ПР после лечения.

Проведено достаточно много исследований ПР, но механизмы их формирования еще окончательно не установлены, а стратегия профилактики и лечения не имеет эффективных результатов.

В последнее время доказана важная роль генетической предрасположенности в формировании гипертрофических и, особенно, келоидных рубцов, полиморфизмы таких генов как p53, TGF- β , SMAD, HLA, которые выступают в качестве этиологических факторов, которые способствуют возникновению ПР [6].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить связь полиморфизма rs1800471 гена TGFB1 с развитием патологических рубцов,

а также связь с содержанием иммунорегуляторных цитокинов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 72 пациента с ПР, находившихся под наблюдением в течение 9-12 месяцев в Институте неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака с 2015-2021 гг. по поводу ПР, развившихся после проведенных оперативных вмешательств по поводу огнестрельных и минно-взрывных ранений. В исследуемых группах средний возраст больных составил $38,8 \pm 2,4$ лет. В контрольную группу были включены 100 человек соответствующего возрастного и гендерного распределения, которые после оперативных вмешательств не имели признаков ПР.

Анализ полиморфизма rs1800471 гена TGFB1 изучали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с дальнейшей электрофоретической разгонкой продуктов амплификации в 3% агарозном геле, приготовленном на TBE-буфере в горизонтальной камере при напряжении электрического поля 10 В/см от источника постоянного тока «Эльф-4» (ООО «ДНК-Технология», РФ). Детекцию фрагментов ДНК осуществляли после окрашивания 1% раствором бромистого этидия в проходящем ультрафиолетовом свете при длине волны 312 нм в трансиллюминаторе «TFX-20 M» («Vilber Lourmat», Франция).

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов цельной венозной крови проводили с использованием комплекта реактивов «ДНК-экспресс-кровь» НПФ «Литех» (РФ). ПЦР осуществляли на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология, Россия). С каждым образцом выделенной ДНК проводили амплификацию с двумя аллель-специфическими праймерами, соответственно контекста SNP (Arg25Pro). Каждая проба ДНК за-

нимала в геле 2 лунки. В первую вводили амплифицированную реакционную смесь с праймерами, специфическими к G-аллели, в другую – к C-аллели. В результате анализа обнаруживали следующие варианты генотипов rs2010963: гомозиготы по предковой и минорной аллели G/G и C/C, соответственно, и гетерозиготу G/C. В качестве набора реагентов для амплификации применяли «SNP-экспресс, TGF-β1 (Arg25Pro)», НПФ «Литех» (РФ).

Статистическую обработку данных проводили с помощью методов вариационной статистики с использованием пакета компьютерных программ Statistica 10 (StatSoft, Inc., США). Частоты распределения генотипов в исследуемых выборках проверяли на отклонение от равновесия Харди-Вайнберга с помощью критерия χ^2 Пирсона [7]. Достоверность различий в распределении частот генотипов и аллелей при сравнении групп «случай-контроль» оценивали с помощью анализа таблиц сопряженности 3×2 и 2×2, соответственно по критерию χ^2 . Степень ассоциации генотипов и аллелей с заболеванием определяли по величине отношения шансов (ОШ). Величина ОШ больше 1 указывала на повышение, а ниже 1 – на снижение риска, при условии попадания в 95% доверительный интервал (95%

ДИ). Все различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

В плазме, полученной после центрифугирования крови, взятой у больных утром натощак из кубитальной вены в объеме 4 мл с помощью вакуумной системы типа «Vacutainer», содержащей ЭДТА, исследовали содержание иммунорегуляторных цитокинов методом иммуноферментного анализа TNFα, IL6, IL10 и TGF-β1 (Вектор-Бест, Россия и Bender Medsystems, Австрия) на фотометре Multiscan EX, (Thermo Electron Corp., Финляндия).

Для статистического описания результатов вычисляли медиану (Me) и межквартильный интервал (Q1;Q3). Сравнение результатов между независимыми выборками осуществляли с помощью критерия Kruskal-Wallis (H), значимость различий учитывали при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение частот генотипов полиморфизма rs1800471 гена TGFB1 и оценку соответствия популяционного равновесия Харди-Вайнберга проводили в контрольной группе и группе больных с ПР. Отклонение от равновесия Харди-Вайнберга не было выявлено ни для одной из изученных выборок (табл. 1).

Таблица 1.

Распределение генотипов полиморфизма rs1800471 гена TGFB1 в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга в группах больных с наличием и отсутствием ПР

Генотип	Группа сравнения n=72	Контрольная группа n=100
GG	55 (76,4%)	58 (58,0%)
GC	18 (22,2%)	40 (40,0%)
CC	1 (1,4%)	2 (2,0%)
	$\chi^2=2,74; p=0,266$	$\chi^2=0,19; p=1,035$

Таблица 2.

Распределение генотипов и аллелей rs1800471 гена TGFB1 в группах пациентов с наличием и отсутствием патологических рубцов и их связь с наличием групповых различий

Генотипы	Группа сравнения n=72 (%)	Контрольная группа n=100 (%)	χ^2	p	ОШ	95% ДИ
GG	55 (0,764)	58 (0,580)	6,308	0,045	2,343	1,2-4,59
GC	16 (0,222)	40 (0,400)			0,429	0,22-0,85
CC	1 (0,014)	2 (0,020)			0,690	0,06-7,76
Аллели	n=144	n=200				
G	126 (0,875)	156 (0,78)	5,114	0,025	1,974	1,09-3,59
C	18 (0,125)	44 (0,22)			0,506	0,28-0,92

Примечания: χ^2 - критерий Пирсона; p – достоверность различий между группами; ОШ – отношение шансов; 95% ДИ – 95% доверительный интервал для ОШ.

Таблица 3.
Влияние полиморфизма rs1800471 гена TGFB1 на содержание иммунорегуляторных цитокинов

Показатель	Me (QI-QIII)			H, P
	GG, n=55	GC, n=16	CC, n=1	
TNF α пг/мл 10,28 (9,83;10,77) min 5,78 max 16,75	10,12 (9,75;10,45) min 5,78 max 10,86	11,27 (11,06;11,46) min 10,54 max 14,15	16,75 -	H=37,8 p<0,001
IL6 пг/мл 63,78 (59,72;65,86) min 7,45 max 194,5	62,1 (57,86;64,43) min 7,45 max 66,78	72,42 (68,53;145,64) min 65,96 max 194,6	186,8 -	H=36,4 p<0,001
IL10 пг/мл 84,92 (43,99;91,39) min 4,74 max 127,65	89,28 (77,3;93,99) min 42,58;max 127,65	27,36 (23,54;32,76) min 4,74 max 40,34	22,12 -	H=40,2 p<0,001
TGF- β 1 24398 (20849,5; 28518,3) min 15108 max 31234	26092,5 (23431,5; 29327,75) min 18386; max 31234	17384 (16191;19554) min 15753; max 22436	16357 -	H=33,29 p<0,001

Анализ распределения генотипов и аллелей rs1800471 гена TGFB1 между пациентами с ПР и лицами контрольной группы (табл. 2.) показал наличие связи генотипов с развитием ПР ($\chi^2=6,31$; $p=0,045$) и, в тоже время, наличие связи аллелей с развитием ПР ($\chi^2=5,114$; $p=0,025$).

Таким образом, установлено, что предковая аллель GG и аллель G rs1800471 увеличивали шансы развития ПР в 2,34 раза в 1,97 раза, соответственно, и являлись фактором риска развития фибропролиферативных заболеваний кожи.

Далее было изучено влияние полиморфизма rs1800471 гена TGFB1 на показатели иммунорегуляторных цитокинов, которые участвовали в про- и противовоспалительным эффектах при развитии ПР (табл. 3.).

Влияние генотипов полиморфизма rs1800471 гена TGFB1 на уровень иммунорегуляторных факторов выявлено при определении: TNF α (H=37,8; $p<0,001$), IL6 (H=36,4; $p<0,001$), IL10 (H=40,2; $p<0,001$), TGF- β 1 (H=33,29; $p<0,001$). При этом уровни цитокинов TNF α и IL6 в крови были существенно повышены в 1,65 и в 3 раза ($p<0,001$) при наличии минорного генотипа CC, соответственно, в сравнении с предковым генотипом GG. Выявленное влияние генотипов полиморфизма rs1800471 гена TGFB1 на уровень

IL10 и TGF- β 1 показало, что у носителей минорного генотипа CC содержание цитокинов было снижено в 4 и 1,6 раза по сравнению с предковым генотипом GG.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно сделать вывод, что полиморфизм rs1800471 гена TGFB1 имел связь с развитием ПР. Проведенное исследование позволило установить общую патогенетическую закономерность: наличие генотипа GG и аллели G является патогенетическим фактором риска развития ПР, а одним из механизмов гиперпролиферации рубцов, вероятно, является избыточная экспрессия гена TGF- β 1, что приводит к увеличению синтеза TGF- β 1 – цитокина профиброгенного и иммуносупрессивного действия. Носительство генотипа GG способствовало увеличению концентрации цитокинов IL10 и TGF- β 1, а также снижению TNF α и IL6, что, вероятно, связано с некоторым уменьшением синтеза коллагена и чрезмерного рубцевания, возможно, за счет увеличения соотношений MMP1/TIMP3, MMP2/TIMP3, снижением пролиферации фибробластов, отложения внеклеточного матрикса, ангиогенеза и реэпителизации.

М.С. Кишняя, Д.В. Соболев, А.В. Висягин, Е.В. Анчикова

ФГБОУ ВО «Донецкий государственный медицинский университет имени М. Горького» МЗ РФ, Донецк

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ ПОЛИМОРФИЗМА rs1800471 ГЕНА TGFB1 С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ БОЕВОЙ ТРАВМЕ И ЦИТОКИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИЕЙ

Послеоперационные осложнения возникают после травматических повреждений, хирургических вмешательств, ожогов и др. приводят к функциональным нарушениям, косметическим дефектам, а также значительно влияют на качество жизни. Результаты исследований по определению генетической де-

терминированности и цитокиновой регуляции имеют противоречивый характер и требуют дальнейшего поиска. Цель исследования: определить связь полиморфизма rs1800471 гена TGFB1 с развитием патологических рубцов, а также связь с содержанием иммунорегуляторных цитокинов. В исследование включе-

ны 72 пациента с патологическими рубцами и 100 человек без патологических рубцов. В крови исследовали уровень цитокинов TNF α , IL6, IL10, TGF- β 1. Полиморфизм rs1800471 гена TGF- β 1 определяли методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией с помощью тест-системы производства НПФ Литех (Россия). Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 10 (StatSoft, Inc., США). У пациентов с патологическими рубцами с развитием патологических рубцов были связаны распределение генотипов ($\chi^2=6,38$; $p=0,045$) и аллелей ($\chi^2=5,11$; $p=0,025$) rs1800471 гена TGF- β 1. Предковый генотип GG увеличивал шансы развития

патологических рубцов (ВШ=2,34; 95% ДИ 1,2-4,59). Установлено влияние ($p<0,001$) генотипов rs1800471 на уровень TNF α , IL6, IL10, TGF- β 1. Значительное увеличение уровней TNF α и IL6 выявлено при наличии минорного генотипа CC, увеличение IL10 и TGF- β 1 – при наличии предкового генотипа GG ($p<0,001$). Полиморфизм rs1800471 гена TGF- β 1 имел связь с развитием патологических рубцов, что было связано с предковым генотипом GG, увеличением синтеза IL10 и TGF- β 1 и снижением – TNF α , IL6.

Ключевые слова: послеоперационные осложнения, патологические рубцы, полиморфизм rs1800471 гена TGF- β 1, генотип, цитокины.

M.S. Kishenya, D.V. Sobolev, A.V. Visyagin, E.V. Anchikova

FSBEI HE «M. Gorky Donetsk State Medical University» MOH Russia, Donetsk

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP OF rs1800471 POLYMORPHISM OF THE TGFB1 GENE WITH THE RISK OF POST-TRAUMATIC COMPLICATIONS IN COMBAT TRAUMA AND CYTOKINE REGULATION

Postoperative complications occur after traumatic injuries, surgical interventions, burns, etc. they lead to functional disorders, cosmetic defects, and also significantly affect the quality of life. The results of studies on the determination of genetic determinacy and cytokine regulation are contradictory and require further search. The aim of the study was to determine the relationship of the rs1800471 polymorphism of the TGFB1 gene with the development of pathological scars, as well as the relationship with the content of immunoregulatory cytokines. The study included 72 patients with pathological scars and 100 people without pathological scars. The blood levels of cytokines TNF α , IL6, IL10, TGF- β 1 were studied. The polymorphism rs1800471 of the TGF- β 1 gene was determined by polymerase chain reaction methods with electrophoretic detection using a test system manufactured by NPF Litech (Russia). The Statistica 10 program (StatSoft, Inc., USA) was used for statistical data processing. In patients with pathological scars, the

distribution of genotypes ($\chi^2=6.38$; $p=0.045$) and alleles ($\chi^2=5.11$; $p=0.025$) of rs1800471 of the TGF- β 1 gene were associated with the development of pathological scars. The ancestral genotype GG increased the chances of developing pathological scars (HS=2.34; 95% CI 1.2-4.59). The influence of ($p<0,001$) rs1800471 genotypes on the level of TNF α , IL6, IL10, TGF- β 1 was established. A significant increase in TNF α and IL6 levels was detected in the presence of a minor CC genotype, an increase in IL10 and TGF- β 1 – in the presence of an ancestral GG genotype ($p<0,001$). The polymorphism rs1800471 of the TGF- β 1 gene was associated with the development of pathological scars, which was associated with the ancestral genotype GG, an increase in the synthesis of IL10 and TGF- β 1 and a decrease in TNF α , IL6.

Key words: postoperative complications, pathological scars, polymorphism rs1800471 of the TGF- β 1 gene, genotype, cytokines.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуманенко Е.К. Военно-полевая хирургия: учебник. М.; 2012. 768.
2. Фисталь Э.Я., Долгошапко О.Н. и др. Специализированная хирургическая помощь при боевой травме: учебное пособие. Донецк, 2019. 237.
3. Кеннет А. Коррекция рубцов. М.; 2009. 116.
4. Linjawi S., Tork E., Shaibah R. Genetic association of the COL1A1 gene promoter -1997 G/T (rs1107946) and Sp1 +1245 G/T (rs1800012) polymorphisms and keloid scars in a Jeddah population. Turk J Med Sci. 2016; 46.(2): 414-23.
5. Chike-Obi C.J., Cole P.D., Brissett A.E. Keloids: pathogenesis, clinical features, and management. Semin Plast Surg. 2009; 23 (3): 178-184. doi: 10.1055/s-0029-1224797
6. Shih B., Bayat A. Genetics of keloid scarring. Arch Dermatol Res 2010; 302(5): 319-339.
7. Бабич П.Н., Чубенко А.В., Лапач С.Н. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение второе. Применение критерия Хи-квадрат Украинский медицинский часопис. 2004; 2 (40): 138-144.

REFERENCES

1. Gumanenko E.K. Voenno-polevaya khirurgiya: uchebnik. M.; 2012. 768 (in Russian).
2. Fistal' E.Ya., Dolgoshapko O.N. i dr. Spetsializirovannaya khirurgicheskaya pomoshch' pri boevoi travme: uchebnoe posobie. Donetsk, 2019. 237 (in Russian).
3. Kennet A. Korrektsiya rubtsov. M.; 2009. 116.
4. Linjawi S., Tork E., Shaibah R. Genetic association of the COL1A1 gene promoter -1997 G/T (rs1107946) and Sp1 +1245 G/T (rs1800012) polymorphisms and keloid scars in a Jeddah population. Turk J Med Sci. 2016; 46.(2): 414-23.
5. Chike-Obi C.J., Cole P.D., Brissett A.E. Keloids: pathogenesis, clinical features, and management. Semin Plast Surg. 2009; 23 (3): 178-184. doi: 10.1055/s-0029-1224797
6. Shih B., Bayat A. Genetics of keloid scarring. Arch Dermatol Res 2010; 302(5): 319-339.
7. Babich P.N., Chubenko A.V., Lapach S.N. Primenenie sovremennykh statisticheskikh metodov v praktike klinicheskikh issledovaniy. Soobshchenie vtoroe. Primenenie kriteriya Khi-kvadrat Ukrainskii medichnii chasopis. 2004; 2 (40): 138-144 (in Russian).